



#19  
*Regierung*  
*Pres*  
**RECEIVED** *ES* 4/11/01  
APR 03 2001

TECH CENTER 1600/2900

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 195 07 166.2

**Anmeldetag:** 1. März 1995

**Anmelder/Inhaber:** Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung  
des öffentlichen Rechts, Heidelberg/DE

**Bezeichnung:** Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil auf-  
weisendes Fusionspolypeptid

**IPC:** C 07 K, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. März 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Nietiedt



K 2094

### **Zusammenfassung**

#### **Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid**

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

K 2094

Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung des öffentlichen Rechts  
Im Neuenheimer Feld 280  
61920 Heidelberg

### **Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid**

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Es ist bekannt, ein Polypeptid in Form eines Histidin-Fusionspolypeptids zu exprimieren. In einem solchen liegt ein Histidin-Anteil von z.B. 6-18 aufeinander folgenden Histidinresten fusioniert am C- oder N-Terminus des Polypeptids vor. Damit ist es möglich, das Histidin-Fusionspolypeptid mittels einer Nickel-Chelat-Chromatographiesäule aus dem Überstand oder Zellysat der es exprimierenden Zelle zu isolieren.

Vorstehende Säule ist aber teuer. Ferner bedeutet ihr Einsatz einen großen Zeitaufwand. Daher eignet sie sich nicht zum schnellen Nachweis der Expression eines Histidin-Fusionspolypeptids. Ein solcher Nachweis ist aber von Nöten, insbesondere, wenn er zum Screening vieler Zellen herangezogen werden soll.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem die Expression eines Histidin-Fusionspolypeptids schnell nachgewiesen werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch einen Antikörper erreicht, der gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid gerichtet ist.

Ein solcher Antikörper kann ein polyklonaler oder monoklonaler Antikörper sein, wobei ein monoklonaler Antikörper bevorzugt ist. Der Antikörper kann aus jegli-

chem Tier oder dem Menschen erhalten sein, wobei für einen polyklonalen Antikörper Kaninchen und für einen monoklonalen Mäuse bevorzugt sind.

Ferner kann der Antikörper synthetisch sein, wobei ihm ggfs. Teile, die für vorstehende Erkennung nicht notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind, die dem Antikörper weitere günstige Eigenschaften verleihen.

Der Ausdruck "Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid" umfaßt ein Polypeptid (Peptid) jeglicher Art und Länge, das einen Histidin-Anteil aufweist. Ein solches Polypeptid kann von jeglichen Zellen, z.B. Bakterien, Hefen, Insekten-, Pflanzen- und tierischen Zellen, sowie Organismen, z.B. transgenen Tieren, exprimiert sein. Ein vorstehender Histidin-Anteil kann z.B. 6-18, vorzugsweise 6 aufeinander folgende Histidinreste umfassen und fusioniert am N und/oder C-Terminus des Polypeptids vorliegen.

Ein bevorzugter Antikörper der vorliegenden Erfindung, nämlich ein monoklonaler Maus-Antikörper mit vorstehender Erkennung, wurde bei der DSM unter der Nummer ACC 2207 am 15. Febr. 1995 hinterlegt.

Erfindungsgemäße Antikörper können nach üblichen Verfahren hergestellt werden. Sollen polyklonale bzw. monoklonale Antikörper hergestellt werden, ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen für erstere und Mäuse für letztere Antikörper, mit einem vorstehenden Histidin-Fusionspolypeptid, z.B. His p53 (vgl. deutsche Patentanmeldung P 42 32 823.3) oder His hdm2 (vgl. deutsche Patentanmeldung P 43 39 553.3), vorzugsweise einem Gemisch aus solchen zu immunisieren. Weiteres Boostern der Tiere kann mit dem oder den gleichen Histidin-Fusionspolypeptiden erfolgen. Auch können andere Histidin-Fusionspolypeptide oder eine Kombination aus diesen und dem oder den vorhergehenden Histidin-Fusionspolypeptiden zum Boostern verwendet werden. Die polyklonalen Antikörper können dann aus dem Serum der Tiere erhalten werden. Für die monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Zur Herstellung von synthetischen Antikörpern kann z.B. von vorstehend erhaltenen, monoklonalen Antikörpern ausgegangen werden. Hierzu bietet sich an, die Antigen-Bindungsregionen der monoklonalen Antikörper zu analysieren und die für vorstehende Erkennung notwendigen und nicht notwendigen Teile zu identifizieren. Die notwendigen Teile können dann modifiziert und die nicht notwendigen ganz oder teilweise eliminiert bzw. durch Teile ersetzt werden, die den Antikörpern weitere günstige Eigenschaften verleihen. Auch können Teile außerhalb der Bindungsregionen der Antikörper modifiziert, eliminiert oder ersetzt werden. Der Fachmann weiß, daß sich für vorstehende Maßnahmen insbesondere die DNA-Rekombinationstechnologie eignet. Diese ist ihm bestens vertraut.

Erfindungsgemäße Antikörper zeichnen sich dadurch aus, daß sie beliebige Fusionspolypeptide erkennen, die einen Histidin-Anteil aufweisen. Die Antikörper eignen sich daher zum schnellen Nachweis der Expression solcher Fusionspolypeptide. Dies kann in beliebigen Nachweisverfahren, insbesondere in einem Western Blot, einem ELISA, einer Immunpräzipitation oder einer Immunfluoreszenz, erfolgen. Hierzu können die erfindungsgemäßen Antikörper, wenn es angebracht ist, markiert sein oder in Kombination mit markierten gegen sie gerichteten Antikörpern eingesetzt werden.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

#### **Beispiel 1: Herstellung von monoklonalen Antikörpern**

Zur Immunisierung wurden Mäuse verwendet. Als Antigene wurden His hdm2 (Aminosäure 1-284), His hdm2 (Aminosäure 58-491) und His p53 (Aminosäure 66-393) (vgl. vorstehend) verwendet. Diese waren in einem Puffer aus 8 M Harnstoff, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris-HCl gelöst.

**Immunisierungs- und Boosterschema:**

Tag 1: 50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)  
50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)  
50  $\mu$ l PBS (Phosphat-gepufferte Saline)  
150  $\mu$ l Freund's Adjuvans komplett

-----

300  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in eine Maus injiziert

Tag 30: 50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)  
50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)  
20  $\mu$ l PBS  
120  $\mu$ l Freund's Adjuvans inkomplett

-----

240  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 60: 50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)  
50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)  
85  $\mu$ l PBS  
115  $\mu$ l Freund's Adjuvans inkomplett

-----

300  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 90: 50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)  
50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)  
200  $\mu$ l PBS

---

300  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 180: 150  $\mu$ l (= 20  $\mu$ g) His p53 (Aminosäure 66-393)  
150  $\mu$ l Freund's Adjuvans komplett

---

300  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 230: 75  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His p53 (Aminosäure 66-393)  
25  $\mu$ l (= 5  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)  
25  $\mu$ l (= 5  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)  
125  $\mu$ l Freund's Adjuvans inkomplett

---

250  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 260: 75  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His p53 (Aminosäure 66-393)  
25  $\mu$ l (= 5  $\mu$ g) His hdm 2 (Aminosäure 1-284)  
25  $\mu$ l (= 5  $\mu$ g) His hdm 2 (Aminosäure 58-491)  
125  $\mu$ l PBS

---

250  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Am Tag 262 wurde die Maus getötet. Milzzellen wurden ihr entnommen und mit Myelomzellen fusioniert. Es wurden monoklonale Antikörper erhalten. Einer dieser wurde bei der DSM unter ACC 2207 am 15. Febr. 1995 hinterlegt.

### **Beispiel 2: Herstellung von polyklonalen Antikörpern**

Zur Immunisierung wurden Kaninchen verwendet. Es wurden die Antigene von Beispiel 1 verwendet. Das Immunisierung- und Boosterschema war identisch mit jenem von Beispiel 1 bis einschließlich Tag 90.

Tag 92: Aus der Ohrvene des Kaninchens wurden 5 ml Blut entnommen und in einem ELISA bzw. Western-Blot auf Antikörper-Aktivität getestet.

Tag 93: Nach positivem Test am Tag 92, wurden die Tiere getötet und die Antikörper aus dem Serum gewonnen.

### **Beispiel 3: Nachweis von Histidin-Fusionspolypeptiden durch erfindungsgemäße Antikörper**

#### **(a) Western-Blot**

Histidin-Fusionspolypeptide, nämlich His hdm2 (Aminosäure 1-284), His hdm2 (Aminosäure 58-491) und His p53 (Aminosäure 66-393) von Beispiel 1, sowie die Polypeptide hdm2 (Aminosäure 1-284), WAF 1 (=wildtyp aktivierender Faktor) und t16 (= zell. regulierendes Protein) als Kontrolle wurden einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Das Gel wurde über Nacht auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese wurde dann mit vorstehendem, 1:10 bzw. 1:50 verdünnten Antikörper ACC 2207 1 Std. bei 37°C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS (0,05 % Tween 20) wurde ein käuflicher alkalischer Phosphatase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Verdünnung nach Angabe



der Hersteller) zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschrirte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit alkalischer Phosphatase mit Entwicklerlösung (36  $\mu$ M 5'-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400  $\mu$ M Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur bis Banden sichtbar waren.

Es zeigte sich, daß der erfindungsgemäße Antikörper ACC 2207 spezifisch Histidin-Fusionspolypeptide, nicht aber Polypeptide ohne Histidin-Anteil erkennt.

#### (b) ELISA

In eine 96-Loch-Platte wurden pro Loch je 100  $\mu$ l mit 20 ng bzw. 8 ng der Histidin-Fusionspolypeptide bzw. der Kontrollen von (a) einpipettiert. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C schlossen sich 3 kurze Waschschrirte mit PBS an. Anschließend erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen des polymeren Trägers durch einstündige Inkubation mit 1 % BSA in PBS bei 37°C. Der erfindungsgemäße, 1:10 bzw. 1:50 verdünnte Antikörper ACC 2207 wurde 1 Stunde bei 37°C auf der Platte inkubiert. Nach 8 Waschschrirten mit PBS wurde der Peroxidase-gekoppelte Ziege anti-Maus Antikörper von (a) zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten 8 Waschschrirte und anschließend die Peroxidase-Nachweisreaktion mit Entwicklungslösung (50 mM Natriumacetat, 0,4 mM 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin-dihydrochlorid, 4,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur bis Banden sichtbar waren.

Es zeigte sich, daß der erfindungsgemäße Antikörper ACC 2207 spezifisch Histidin-Fusionspolypeptide, nicht aber ein Polypeptid ohne Histidin-Anteil erkennt.

K 2094

**Patentansprüche**

1. Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid.
2. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er polyklonal ist.
3. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
4. Antikörper nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß er bei der DSM unter ACC 2207 hinterlegt ist.
5. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Tier mit einem Histidin-Fusionspolypeptid immunisiert wird, und
  - (a) polyklonale Antikörper aus dem Serum des Tieres erhalten werden, oder
  - (b) monoklonale Antikörper nach Fusion von Milzzellen des Tieres mit Myelomzellen erhalten werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch von Histidin-Fusionspolypeptiden zur Immunisierung eingesetzt wird.
7. Verwendung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1-4 in einem Nachweisverfahren für ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid.
8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Nachweisverfahren ein Western-Blot, ein ELISA, eine Immunfluoreszenz oder eine Immunpräzipitation ist.



# Declaration

In my capacity as a translator for the English language, duly registered, commissioned and sworn in by the President of the Munich I Regional Court (Landgericht München I) I hereby verify the following:

The attached English translation is a true and complete version of the original documents presented to me in the German language.

München,

March 23, 2001

Ursula Scherz



URSULA SCHERZ

Translator for the English language, duly registered, commissioned and sworn in by the Munich I Regional Court

Certified translation of a priority document

**FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY**

(coat of arms)

**Certificate**

The applicant Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts at Heidelberg, Neckar/Germany, filed a patent application entitled

"antibodies active against a fusion polypeptide comprising a histidine portion"

with the German Patent and Trademark Office on March 1, 1995.

The attached piece is a true and exact reproduction of the original document of this patent application.

In the German Patent and Trademark Office, the application was given the preliminary references C 07 K and G 01 N of the International Patent Classification.

München, April 10, 2000

**German Patent and Trademark Office**

**The President**

by order

Sgd. Agurks

File No.: 195 07 166.2

Seal: German Patent  
and Trademark  
Office

K 2094

Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung des öffentlichen Rechts  
Im Neuenheimer Feld 280  
61920 Heidelberg

## **Antibodies active against a fusion polypeptide comprising a histidine portion**

The present invention relates to antibodies which are active against a fusion polypeptide comprising a histidine portion, a process for the preparation thereof and their use.

It is known to express a polypeptide in the form of a histidine fusion polypeptide. In such a polypeptide, a histidine portion of e.g. 6-18 successive histidine residues is fused to the C or N terminus of the polypeptide. Hence it is possible to isolate the histidine fusion polypeptide by means of a nickel-chelate chromatographic column from the supernatant or cell lysate of the cell expressing it.

However, the above column is expensive. Furthermore, its use costs a lot of time. Therefore, it is not suited for the rapid detection of the expression of a histidine fusion polypeptide. But such a detection is necessary, particularly when it shall be used for screening many cells.

Thus, it is the object of the present invention to provide means by which the expression of a histidine fusion polypeptide can be detected rapidly.

According to the invention this is achieved by an antibody which is directed against a fusion polypeptide comprising a histidine portion.

Such an antibody may be a polyclonal or monoclonal antibody, a monoclonal antibody being preferred. The antibody may be obtained from any animal or human being, rabbits being preferred for a polyclonal antibody and mice being preferred for a monoclonal antibody.

In addition, the antibody may be synthetic, portions which are not necessary for the above-mentioned identification

optionally lacking fully or partially therefrom and these portions being replaced by others which give the antibody further favorable properties, respectively.

The expression "fusion polypeptide comprising a histidine portion" comprises a polypeptide (peptide) of any kind and length which has a histidine portion. Such a polypeptide may be expressed by any cells, e.g. bacteria, yeasts, cells of insects, plants and animals, as well as organisms, e.g. transgenic animals. An above histidine portion may comprise e.g. 6-18, preferably 6, successive histidine residues and be fused to the N and/or C terminus of the polypeptide.

A preferred antibody of the present invention, namely a monoclonal mouse antibody having the above identification, was deposited under No. ACC 2207 with the DSM [German-type collection of microorganisms] on February 15, 1995.

Antibodies according to the invention can be prepared according to conventional methods. If polyclonal antibodies and monoclonal antibodies, respectively, are to be prepared, it will be favorable to immunize animals, particularly rabbits for the former antibodies and mice for the latter antibodies, with an above histidine fusion polypeptide e.g. His p53 (cf. German patent application P 42 32 823.3) or His hdm2 (cf. German patent application P 43 39 553.3), preferably a mixture thereof. The animals can be further boosted with the same histidine fusion polypeptide or polypeptides. Other histidine fusion polypeptides or a combination of these and the preceding histidine fusion polypeptide or polypeptides may also be used for boosting. The polyclonal antibodies may then be obtained from the serum of the animals. Spleen cells of the animals are fused with myeloma cells for the monoclonal antibodies.

For the preparation of synthetic antibodies, e.g. the above-obtained monoclonal antibodies may be used as a basis. For this purpose, it is the obvious thing to analyze

the antigen-binding region of the monoclonal antibodies and identify the portions which are necessary and not necessary for the above identification. The necessary portions may then be modified and the non-necessary portions can be fully or partially eliminated and replaced by portions giving the antibodies further favorable properties, respectively. Also, portions can be modified, eliminated or replaced beyond the binding regions of the antibodies. A person skilled in the art knows that particularly the DNA recombination technology is suitable for the above measures. He is perfectly familiar therewith.

Antibodies according to the invention distinguish themselves in that they recognize any fusion polypeptides comprising a histidine portion. Therefore, the antibodies are suitable for the rapid detection of the expression of such fusion polypeptides. This may be carried out in any detection methods, particularly in a Western blot, an ELISA, an immunoprecipitation or an immunofluorescence. For this purpose, the antibodies according to the invention may be labeled, if appropriate, or used in combination with labeled antibodies directed thereagainst.

The present invention is explained by the below examples.

**Example 1: Preparation of monoclonal antibodies**

Mice were used for immunization. His hdm2 (amino acid 1-284), His hdm2 (amino acid 58-491) and His p53 (amino acid 66-393) (cf. above) were used as antigens. They were dissolved in a buffer comprising 8 M urea, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris-HCl.



Immunization and booster pattern:

Day 1: 50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (amino acid 1-284)  
50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (amino acid 58-491)  
50  $\mu$ l PBS (phosphate-buffered saline)  
150  $\mu$ l Freund's adjuvant complete

-----

300  $\mu$ l mix

200  $\mu$ l of the mix were injected into a mouse

Day 30: 50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (amino acid 1-284)  
50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (amino acid 58-491)  
20  $\mu$ l PBS  
120  $\mu$ l Freund's adjuvant incomplete

-----

240  $\mu$ l mix

200  $\mu$ l of the mix were injected into the above mouse.

Day 60: 50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (amino acid 1-284)  
50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (amino acid 58-491)  
85  $\mu$ l PBS  
115  $\mu$ l Freund's adjuvant incomplete

-----

300  $\mu$ l mix

200  $\mu$ l of the mix were injected into the above mouse.

Day 90: 50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (amino acid 1-284)  
50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (amino acid 58-491)  
200  $\mu$ l PBS

-----

300  $\mu$ l mix

200  $\mu$ l of the mix were injected into the above mouse.

Day 180: 150  $\mu$ l (= 20  $\mu$ g) His p53 (amino acid 66-393)  
150  $\mu$ l Freund's adjuvant complete

-----

300  $\mu$ l mix

200  $\mu$ l of the mix were injected into the above mouse.

Day 230: 75  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His p53 (amino acid 66-393)  
25  $\mu$ l (= 5  $\mu$ g) His hdm2 (amino acid 1-284)  
25  $\mu$ l (= 5  $\mu$ g) His hdm2 (amino acid 58-491)  
125  $\mu$ l Freund's adjuvant incomplete

-----

250  $\mu$ l mix

200  $\mu$ l of the mix were injected into the above mouse.

Day 260: 75  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His p53 (amino acid 66-393)  
25  $\mu$ l (= 5  $\mu$ g) His hdm2 (amino acid 1-284)  
25  $\mu$ l (= 5  $\mu$ g) His hdm2 (amino acid 58-491)  
125  $\mu$ l PBS

-----

250  $\mu$ l mix

200  $\mu$ l of the mix were injected into the above mouse.

The mouse was killed on day 262. Spleen cells were removed therefrom and fused with myeloma cells. Monoclonal antibodies were obtained. One of them was deposited under ACC 2207 with DSM on February 15, 1995.

#### Example 2: Preparation of polyclonal antibodies

Rabbits were used for immunization. The antigens of Example 1 were employed. The immunization and booster pattern was identical with that of Example 1 up to day 90 inclusive.

Day 92: 5 ml of blood were removed from the rabbit's auricular vein and tested for antibody activity in an ELISA and Western blot, respectively.

Day 93: Following a positive test on day 92, the animals were killed and the antibodies were obtained from the serum.

**Example 3:** Detection of histidine fusion polypeptides by antibodies according to the invention

(a) Western blot

Histidine fusion polypeptides, namely His hdm2 (amino acid 1-284), His hdm2 (amino acid 58-491) and His p53 (amino acid 66-393) of Example 1, as well as the polypeptides hdm2 (amino acid 1-284), WAF 1 (= wild type-activating factor) and t16 (= cell-regulating protein) as control were subjected to a polyacrylamide gel eletrophoresis. The gel was transferred overnight to a nitrocellulose membrane. It was then incubated with the above antibody ACC 2207 diluted in a ratio of 1:10 and 1:50, respectively, at 37°C for 1 hour. After several wash steps using PBS (0.05 % Tween 20), a purchasable alkaline phosphatase-coupled goat-anti-mouse antibody (dilution according to the manufacturer's indication) was added. A 30-minute incubation at 37°C was followed by several wash steps using PBS and thereafter the alkaline phosphatase detection reaction with alkaline phosphatase including developing solution (36  $\mu$ M 5'-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, 400  $\mu$ M nitroblue tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) at room temperature until bands were visible.

It showed that the antibody ACC 2207 according to the invention recognizes specifically histidine fusion polypeptides but not polypeptides without histidine portion.

(b) ELISA

A 96-well plate was provided per well with 100  $\mu$ l each, which included 20 ng and 8 ng, respectively, of the histidine fusion polypeptides and the controls of (a), respectively. After incubation at 4°C overnight, 3 short wash steps using PBS followed. Thereafter, the free binding sites of the polymeric carrier were blocked by one-hour incubation using 1 % BSA in PBS at 37°C. The antibody ACC 2207 according to the invention which was diluted in a ratio of 1:10 and 1:50, respectively, was incubated on the plate at 37°C for 1 hour. After 8 wash steps using PBS, the peroxidase-coupled goat anti-mouse antibody of (a) was added. A 30-minute incubation at 37°C was followed by 8 wash steps and thereafter the peroxidase detection reaction with developing solution (50 mM sodium acetate, 0.4 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at room temperature until bands were visible.

It showed that the antibody ACC 2207 according to the invention recognizes specifically histidine fusion polypeptides but not a polypeptide without histidine portion.

Claims

1. An antibody against a fusion polypeptide comprising a histidine portion.
2. The antibody according to claim 1, characterized in that it is polyclonal.
3. The antibody according to claim 1, characterized in that it is monoclonal.
4. The antibody according to claim 3, characterized in that it is deposited under ACC 2207 with DSM [German-type culture collection for microorganisms].
5. A process for the preparation of an antibody according to any one of claims 1 to 4, characterized in that an animal is immunized with a histidine fusion polypeptide and
  - (a) polyclonal antibodies are obtained from the serum of the animal, or
  - (b) monoclonal antibodies are obtained after the fusion of animal's spleen cells with myeloma cells.
6. The process according to claim 5, characterized in that a mixture of histidine fusion polypeptides is used for immunization.
7. Use of an antibody according to any one of claims 1 to 4 in a detection method for a fusion polypeptide comprising a histidine portion.
8. Use according to claim 7, wherein the detection method is a Western blot, an ELISA, an immunofluorescence or an immunoprecipitation.

**Abstract of the Disclosure**

**Antibodies active against a fusion polypeptide comprising a  
histidine portion**

The present invention relates to an antibody active against a fusion polypeptide comprising a histidine portion, a process for the preparation thereof and its use.



## Bescheinigung

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts in Heidelberg, Neckar/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid"

am 1. März 1995 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 10. April 2000

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, likely belonging to the President of the German Patent and Trademark Office.

Aktenzeichen: 195 07 166.2



*Ag...*

**Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung des öffentlichen Rechts  
Im Neuenheimer Feld 280  
61920 Heidelberg**

**Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid**

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Es ist bekannt, ein Polypeptid in Form eines Histidin-Fusionspolypeptids zu exprimieren. In einem solchen liegt ein Histidin-Anteil von z.B. 6-18 aufeinander folgenden Histidinresten fusioniert am C- oder N-Terminus des Polypeptids vor. Damit ist es möglich, das Histidin-Fusionspolypeptid mittels einer Nickel-Chelat-Chromatographiesäule aus dem Überstand oder Zellysat der es exprimierenden Zelle zu isolieren.

vorstehende Säule ist aber teuer. Ferner bedeutet ihr Einsatz einen großen Zeitaufwand. Daher eignet sie sich nicht zum schnellen Nachweis der Expression eines Histidin-Fusionspolypeptids. Ein solcher Nachweis ist aber von Nöten, insbesondere, wenn er zum Screening vieler Zellen herangezogen werden soll.

In der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem die Expression eines Histidin-Fusionspolypeptids schnell nachgewiesen werden kann.

Entsprechend wird dies durch einen Antikörper erreicht, der gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid gerichtet ist.

solcher Antikörper kann ein polyklonaler oder monoklonaler Antikörper sein, wobei ein monoklonaler Antikörper bevorzugt ist. Der Antikörper kann aus jegli-



chem Tier oder dem Menschen erhalten sein, wobei für einen polyklonalen Antikörper Kaninchen und für einen monoklonalen Mäuse bevorzugt sind.

Ferner kann der Antikörper synthetisch sein, wobei ihm ggfs. Teile, die für vorstehende Erkennung nicht notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind, die dem Antikörper weitere günstige Eigenschaften verleihen.

Der Ausdruck "Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid" umfaßt ein Polypeptid (Peptid) jeglicher Art und Länge, das einen Histidin-Anteil aufweist. Ein solches Polypeptid kann von jeglichen Zellen, z.B. Bakterien, Hefen, Insekten-, Pflanzen- und tierischen Zellen, sowie Organismen, z.B. transgenen Tieren, exprimiert sein. Ein vorstehender Histidin-Anteil kann z.B. 6-18, vorzugsweise 6 aufeinander folgende Histidinreste umfassen und fusioniert am N und/oder C-Terminus des Polypeptids vorliegen.

Ein bevorzugter Antikörper der vorliegenden Erfindung, nämlich ein monoklonaler Maus-Antikörper mit vorstehender Erkennung, wurde bei der DSM unter der Nummer ACC 2207 am 15. Febr. 1995 hinterlegt.

Erfindungsgemäße Antikörper können nach üblichen Verfahren hergestellt werden. Um polyklonale bzw. monoklonale Antikörper hergestellt werden, ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen für erstere und Mäuse für letztere Antikörper, mit dem vorstehenden Histidin-Fusionspolypeptid, z.B. His p53 (vgl. deutsche Patentanmeldung P 42 32 823.3) oder His hdm2 (vgl. deutsche Patentanmeldung 43 39 553.3), vorzugsweise einem Gemisch aus solchen zu immunisieren. Weiteres Boostern der Tiere kann mit dem oder den gleichen Histidin-Fusionspolypeptiden erfolgen. Auch können andere Histidin-Fusionspolypeptide oder eine Kombination aus diesen und dem oder den vorhergehenden Histidin-Fusionspolypeptiden zum Boostern verwendet werden. Die polyklonalen Antikörper können aus dem Serum der Tiere erhalten werden. Für die monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Zur Herstellung von synthetischen Antikörpern kann z.B. von vorstehend erhaltenen, monoklonalen Antikörpern ausgegangen werden. Hierzu bietet sich an, die Antigen-Bindungsregionen der monoklonalen Antikörper zu analysieren und die für vorstehende Erkennung notwendigen und nicht notwendigen Teile zu identifizieren. Die notwendigen Teile können dann modifiziert und die nicht notwendigen ganz oder teilweise eliminiert bzw. durch Teile ersetzt werden, die den Antikörpern weitere günstige Eigenschaften verleihen. Auch können Teile außerhalb der Bindungsregionen der Antikörper modifiziert, eliminiert oder ersetzt werden. Der Fachmann weiß, daß sich für vorstehende Maßnahmen insbesondere die DNA-Rekombinationstechnologie eignet. Diese ist ihm bestens vertraut.

Erfindungsgemäße Antikörper zeichnen sich dadurch aus, daß sie beliebige Fusionspolypeptide erkennen, die einen Histidin-Anteil aufweisen. Die Antikörper eignen sich daher zum schnellen Nachweis der Expression solcher Fusionspolypeptide. Dies kann in beliebigen Nachweisverfahren, insbesondere in einem Western Blot, einem ELISA, einer Immunpräzipitation oder einer Immunfluoreszenz, erfolgen. Hierzu können die erfindungsgemäßen Antikörper, wenn es angebracht ist, markiert sein oder in Kombination mit markierten gegen sie gerichteten Antikörpern eingesetzt werden.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

#### **Beispiel 1: Herstellung von monoklonalen Antikörpern**

Zur Immunisierung wurden Mäuse verwendet. Als Antigene wurden His hdm2 (Aminosäure 1-284), His hdm2 (Aminosäure 58-491) und His p53 (Aminosäure 66-393) (vgl. vorstehend) verwendet. Diese waren in einem Puffer aus 8 M Harnstoff, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris-HCl gelöst.

**Immunisierungs- und Boosterschema:**

Tag 1:        50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)  
              50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)  
              50  $\mu$ l PBS (Phosphat-gepufferte Saline)  
              150  $\mu$ l Freund's Adjuvans komplett

-----

300  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in eine Maus injiziert

Tag 30:       50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)  
              50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)  
              20  $\mu$ l PBS  
              120  $\mu$ l Freund's Adjuvans inkomplett

-----

240  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 60:       50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)  
              50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)  
              85  $\mu$ l PBS  
              115  $\mu$ l Freund's Adjuvans inkomplett

-----

300  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 90: 50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)  
50  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)  
200  $\mu$ l PBS

---

300  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 180: 150  $\mu$ l (= 20  $\mu$ g) His p53 (Aminosäure 66-393)  
150  $\mu$ l Freund's Adjuvans komplett

---

300  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 230: 75  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His p53 (Aminosäure 66-393)  
25  $\mu$ l (= 5  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)  
25  $\mu$ l (= 5  $\mu$ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)  
125  $\mu$ l Freund's Adjuvans inkomplett

---

250  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 260: 75  $\mu$ l (= 10  $\mu$ g) His p53 (Aminosäure 66-393)  
25  $\mu$ l (= 5  $\mu$ g) His hdm 2 (Aminosäure 1-284)  
25  $\mu$ l (= 5  $\mu$ g) His hdm 2 (Aminosäure 58-491)  
125  $\mu$ l PBS

---

250  $\mu$ l Mix

200  $\mu$ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Am Tag 262 wurde die Maus getötet. Milzzellen wurden ihr entnommen und mit Myelomzellen fusioniert. Es wurden monoklonale Antikörper erhalten. Einer dieser wurde bei der DSM unter ACC 2207 am 15. Febr. 1995 hinterlegt.

### **Beispiel 2: Herstellung von polyklonalen Antikörpern**

Zur Immunisierung wurden Kaninchen verwendet. Es wurden die Antigene von Beispiel 1 verwendet. Das Immunisierungs- und Boosterschema war identisch mit jenem von Beispiel 1 bis einschließlich Tag 90.

Tag 92: Aus der Ohrvene des Kaninchens wurden 5 ml Blut entnommen und in einem ELISA bzw. Western-Blot auf Antikörper-Aktivität getestet.

Tag 93: Nach positivem Test am Tag 92, wurden die Tiere getötet und die Antikörper aus dem Serum gewonnen.

### **Beispiel 3: Nachweis von Histidin-Fusionspolypeptiden durch erfindungsgemäße Antikörper**

#### **(a) Western-Blot**

Histidin-Fusionspolypeptide, nämlich His hdm2 (Aminosäure 1-284), His hdm2 (Aminosäure 58-491) und His p53 (Aminosäure 66-393) von Beispiel 1, sowie die Polypeptide hdm2 (Aminosäure 1-284), WAF 1 (= wildtyp aktivierender Faktor) und t16 (= zell. regulierendes Protein) als Kontrolle wurden einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Das Gel wurde über Nacht auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese wurde dann mit vorstehendem, 1:10 bzw. 1:50 verdünnten Antikörper ACC 2207 1 Std. bei 37°C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS (0,05 % Tween 20) wurde ein käuflicher alkalischer Phosphatase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Verdünnung nach Angabe

der Hersteller) zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschrirte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit alkalischer Phosphatase mit Entwicklerlösung (36  $\mu$ M 5'-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400  $\mu$ M Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur bis Banden sichtbar waren.

Es zeigte sich, daß der erfindungsgemäße Antikörper ACC 2207 spezifisch Histidin-Fusionspolypeptide, nicht aber Polypeptide ohne Histidin-Anteil erkennt.

#### (b) ELISA

In eine 96-Loch-Platte wurden pro Loch je 100  $\mu$ l mit 20 ng bzw. 8 ng der Histidin-Fusionspolypeptide bzw. der Kontrollen von (a) einpipettiert. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C schlossen sich 3 kurze Waschschrirte mit PBS an. Anschließend erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen des polymeren Trägers durch einstündige Inkubation mit 1 % BSA in PBS bei 37°C. Der erfindungsgemäße, 1:10 bzw. 1:50 verdünnte Antikörper ACC 2207 wurde 1 Stunde bei 37°C auf der Platte inkubiert. Nach 8 Waschschrirten mit PBS wurde der Peroxidase-gekoppelte Ziege anti-Maus Antikörper von (a) zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten 8 Waschschrirte und anschließend die Peroxidase-Nachweisreaktion mit Entwicklungslösung (50 mM Natriumacetat, 0,4 mM 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin-dihydrochlorid, 4,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur bis Banden sichtbar waren.

Es zeigte sich, daß der erfindungsgemäße Antikörper ACC 2207 spezifisch Histidin-Fusionspolypeptide, nicht aber ein Polypeptid ohne Histidin-Anteil erkennt.

K 2094

**Patentansprüche**

1. Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid.
2. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er polyklonal ist.
3. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
4. Antikörper nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß er bei der DSM unter ACC 2207 hinterlegt ist.
5. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Tier mit einem Histidin-Fusionspolypeptid immunisiert wird, und
  - (a) polyklonale Antikörper aus dem Serum des Tieres erhalten werden, oder
  - (b) monoklonale Antikörper nach Fusion von Milzzellen des Tieres mit Myelomzellen erhalten werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch von Histidin-Fusionspolypeptiden zur Immunisierung eingesetzt wird.
7. Verwendung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1-4 in einem Nachweisverfahren für ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid.
8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Nachweisverfahren ein Western-Blot, ein ELISA, eine Immunfluoreszenz oder eine Immunpräzipitation ist.

K 2094

### **Zusammenfassung**

**Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid**

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.